



FREQUÊNCIA E PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM DISTINTAS PORÇÕES DO PLASMA SEMINAL DE DIFERENTES MACHOS SUÍNOS

DANIELI, Valquíria Maria¹; CORCINI, Carine Dahl¹; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio²; LUCIA, Thomaz Jr.¹

¹Laboratório de Reprodução Animal- Faculdade de Veterinária – UFPel

²Instituto de Ciências Biológicas – FURG

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. valquiriadanieli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Durante muitos anos, o plasma seminal foi considerado apenas como um meio de transporte e sustentação dos espermatozóides, desde a ejaculação até a fertilização (KRAUS et al., 2005; TROEDSSON et al., 2005). Porém, WOLFE et al. (1993), baseando-se nas diferenças apresentadas na qualidade seminal, com o uso de bovinos férteis e com degeneração testicular experimental, sugeriram que os conteúdos do plasma seminal influenciavam na fertilidade masculina.

Para a ocorrência de fertilização, o plasma seminal do macho precisa apresentar uma composição apropriada, não só no momento da ejaculação, como também durante o transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (SYNTIN et al, 1996; STRZEZEK et al., 2002; 2005). Existem evidências de que as proteínas do plasma seminal desempenham papel importante na fertilidade masculina, conforme descrito em humanos (AUTIERO et al., 1991) e em suínos (STRZEZEK et al., 2002), o que pode ser atribuído em parte à indução da reação acrossômica (Siciliano et al., 2008).

A maioria dos estudos que identificaram proteínas presentes no plasma seminal em diferentes espécies foi conduzida com eletroforese uni ou bidimensional, caracterizando primeiramente o peso molecular aparente, com posterior busca da identificação de propriedades que possam caracterizar a proteína. Esses estudos visam caracterizar marcadores bioquímicos que possam identificar indivíduos com níveis distintos de qualidade de sêmen, capacidade de suportar criopreservação de sêmen e potencial fertilidade em humanos (Autiero et al., 1991), suínos (Strzeýek et al., 2002), bovinos (Jobim et al., 2004), peixes (Zilli et al., 2005) e búfalos (Asadpour et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência e peso molecular de proteínas identificadas em distintas porções ricas em espermatozóides do plasma seminal de diferentes machos suínos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados quatro machos suínos F1 (Landrace X Large White), instalados na Fazenda da Palma. Foram realizadas seis coletas de cada macho, durante 15 dias, totalizando 24 ejaculados. Os ejaculados foram coletados pelo método da mão enluvada, utilizando frascos de 10 mL aquecidos a 38°C e cobertos com filtro, a fim de separar a fração gelatinosa do sêmen (HANCOCK & HOVEL, 1959). O ejaculado foi dividido durante a coleta em duas porções: Porção 1 (P1) correspondendo aos primeiros 10 mL da fração rica em espermatozoides; e Porção 2 (P2) correspondendo ao restante da fração rica em espermatozoides. Após a coleta, alíquotas de 1 ml de P1 e P2 foram centrifugadas a 2.500 x g por 5 min. Logo após, as amostras foram colocadas em um recipiente com gelo por 1 h. O plasma seminal foi novamente centrifugado a 10.000 x g por 10 min, para a obtenção somente do plasma. Do sobrenadante, retiraram-se 10 µl, aos quais foram adicionados 30 µl de H₂O deionizada e 20 µl de tampão de amostra constituído de: 20% de Glicerol; 10% Tris-HCl 0,6173 M, pH 6,8; 2% β-Mercaptoetanol; 20% Dodecil Sulfato de Sódio a 10% – SDS ; 2,5 mg de Azul de Bromofenol e H₂O deionizada. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 min, para desnaturação das proteínas.

A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) foi realizada com o sistema BIORAD Mini-Protean 3 Cell®, segundo LAEMMLI (1970). Foram feitas corridas com géis de poli(acrilamida) concentrados a 15% (MAŇÁSKOVÁ e JONÁKOVÁ, 2007), primeiramente, com uma voltagem de 70 V por 20 minutos, para promover a concentração das proteínas e, após, a 120 V por 70-80 minutos. Como padrão, foi utilizado o marcador molecular BenchMark Protein Ladder®. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue por 20 minutos (SYNTIN et al., 1996). O processo de descolorimento dos géis foi feito em solução descolorante constituída por 40% Metanol 10% ácido acético glacial e 50% H₂O deionizada, por 1 h, em banho-maria, a 75°C. A análise foi baseada na visualização e distinção das bandas protéicas formadas durante a eletroforese. Os dados obtidos da eletroforese foram analisados pelo *software* TotalLab TL100®, v. 2006. Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do *software* Statistix 8.0® (2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Considerando todas as coletas, o SDS-PAGE identificou 19 bandas protéicas, porém nenhum dos ejaculados apresentou todas essas bandas. As amostras de plasma seminal do macho D apresentaram 13 bandas, as do macho B apresentaram 12 bandas, e as amostras dos machos A e C apresentaram 11 bandas (Tabela 1). Somente sete bandas (com peso molecular de 18, 19, 44, 65, 70, 80 e 100 kDa) foram identificadas no mínimo uma vez em cada porção de cada macho. Os machos B e C apresentaram o mesmo número de bandas, em ambas as porções. No entanto, foi identificada variação no número de bandas, entre as porções, para os machos A (P1 = 11 bandas e P2 = 10 bandas) e D (P1 = 13 bandas e P2 = 11 bandas). A PSP com 22 kDa apareceu somente na primeira porção dos ejaculados dos machos A e D assim como a PSP 132 kDa apareceu somente na primeira porção do ejaculado do macho B.

Na avaliação das proteínas presentes no plasma seminal pela técnica da

eletroforese unidimensional, onde as proteínas são separadas somente pelo seu ponto isoelétrico descrevendo seu peso molecular aproximado dificultam a escolha de um marcador, pois conforme o verificado nesse experimento existe uma variação entre os machos. Assim como outras diferenças na composição protéica do plasma seminal pode ser atribuídas a época do ano, nutrição, raça e fração do ejaculado, o que dificulta a busca de um marcador para selecionar machos de alta fertilidade, conforme o constado por ROCA et al., 2006.

Tabela 1 - Frequência e peso molecular de proteínas identificadas em distintas porções do plasma seminal de diferentes machos suínos.

| Proteína | Macho A | | Macho B | | Macho C | | Macho D | |
|----------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 |
| 18 | 33,3 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 |
| 19 | 50,0 | 50,0 | 100 | 83,3 | 66,7 | 50,0 | 16,7 | 16,7 |
| 21 | 16,7 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16,7 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50,0 | 50,0 | 16,7 | 16,7 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16,7 | 16,7 | 33,3 | 16,7 |
| 42 | 0 | 0 | 0 | 16,7 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 33,3 |
| 44 | 33,3 | 16,7 | 16,7 | 66,7 | 66,7 | 66,7 | 50,0 | 33,3 |
| 65 | 16,7 | 16,7 | 66,7 | 66,7 | 16,7 | 16,7 | 33,3 | 16,7 |
| 70 | 100 | 100 | 33,3 | 33,3 | 83,3 | 83,3 | 83,3 | 83,3 |
| 80 | 50,0 | 66,7 | 83,3 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 87 | 33,3 | 50,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 90 | 0 | 0 | 16,7 | 16,7 | 0 | 0 | 50,0 | 16,7 |
| 94 | 0 | 0 | 16,7 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 16,7 | 33,3 | 50,0 | 50,0 | 66,7 | 50,0 | 33,3 | 33,3 |
| 113 | 33,3 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 120 | 0 | 0 | 33,3 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 16,7 | 0 |
| 128 | 0 | 0 | 16,7 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 132 | 0 | 0 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 24 | 23 | 28 | 31 | 35 | 33 | 30 | 23 |

P1 = primeiros 10 mL da porção do ejaculado rica em espermatozóides e P2 = restante da porção do ejaculado rica em espermatozóides.

4- CONCLUSÃO

Portanto neste estudo ficou comprovada a variabilidade entre as frações e os machos em relação ao número e as proteínas. Demonstrando que estudos mais detalhados ainda são necessários para ajustar não apenas os efeitos individuais, mas também para investigar de forma mais precisa a estrutura e as funções destas proteínas na busca de um marcador bioquímico para características reprodutivas de um macho.

5. AGRADECIMENTO

A FAPERGS pela bolsa de iniciação científica do primeiro autor, a CAPES pela bolsa de doutorado do segundo autor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASADPOUR, R., ALAVI-SHOUSHTARI, S.M., ASRI REZAI, S., ANSARI, M.H.KH. SDS- polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, suppl. v. 102, p. 308 – 313, 2007.

AUTIERO, M., SANSONE, G., ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology** v. 12, p. 191 – 200, 1991.

HANCOCK, J.L., HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record** 71, 664 – 665, 1959.

JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O., WALD, V.B., TRAMONTINA, F., MATTOS, R.C., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semenfreezability. **Theriogenology** 61, 255 – 266, 2004.

KRAUS, M., TICHÁ M, ZELEZNÁ B, PEKNICOVÁ J, JONÁKOVÁ V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**. v.65, p. 33–46, 2005.

MAŇÁSKOVÁ. P., JONÁKOVÁ, V. 2007. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. **Journal of Reproductive Immunology**. In press doi:10.1016/j.jri.2007.10.001

SICILIANO, L., MARCIANO, V., CARPINO, A. Prostate-like vesicles stimulate acrosome reaction pig spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology** 6, 1 – 7, 2008.

STRZEŹEK, J., SAIZ-CIDONCHA, F., WYSOCKI, P., TYSKIEWICZ, A., JASTRZEBSKI. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports** 22, 255 – 266, 2002.

STRZEŹEK, J., WYSOCKI, P., KORDAN, W., KUKLINSKA, M., MOGIELNICKA, M., SOLIWODA, D., FRASER, L. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology** 5, 279 – 290, 2005.

SYNTIN, P., DACHEUX, F., DRUART, X., GATTI, J.L., OKAMURA, N., DACHEUX, J.L. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biology of Reproduction** 55, 956 – 974, 1996.

TROEDSSON, M.H.T. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science** v. 89, p. 171 – 186, 2005.

ROCA, J., HERNÁNDEZ, M., CARVAJAL, G., VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science** 84, 2692 – 2699, 2006.

ZILLI, L., SCHIAVONE, R., ZONNO, V., ROSSANO, R., STORELLI, C., VILELLA, S. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. **Biology of Reproduction** 72, 1262 – 1267, 2005.

WOLFE, D.F., Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology** 40, 1083 – 1091, 1993